

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003 年 12 月 18 日 (18.12.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/104461 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C12N 15/12, 1/21, 5/10, C07K 14/435, 19/00, G01N 21/78 (74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス (SIKS & CO.); 〒104-0031 東京都中央区京橋一丁目 8 番 7 号 京橋日殖ビル 8 階 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP03/07337 (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) 国際出願日: 2003 年 6 月 10 日 (10.06.2003) (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願2002-168584 2002 年 6 月 10 日 (10.06.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 理化学研究所 (RIKEN) [JP/JP]; 〒351-0198 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 Saitama (JP). 株式会社医学生物学研究所 (MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD.) [JP/JP]; 〒460-0002 愛知県名古屋市中区丸の内 3 丁目 5 番 10 号 住友商事丸の内ビル 5 F Aichi (JP).
- (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 宮脇 敦史 (MIYAWAKI, Atsushi) [JP/JP]; 〒351-0198 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 理化学研究所内 Saitama (JP). 唐澤 智司 (KARASAWA, Satoshi) [JP/JP]; 〒396-0002 長野県伊那市大字手良沢岡字大原 1063-103 株式会社医学生物学研究所 伊那研究所内 Nagano (JP).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PIGMENT PROTEIN

(54) 発明の名称: 色素蛋白質

(57) Abstract: It is intended to provide a novel pigment protein originating in *Cnidopus japonicus*. Namely, a pigment protein originating in *Cnidopus japonicus* which has the following characteristics is provided: (1) having a maximum absorption wavelength of 559 nm and having a maximum fluorescence wavelength of 578 nm; (2) having a molar absorption coefficient at 559 nm of 61150; (3) having a quantum yield less than 0.01; and (4) the pH sensitivity of the absorption properties being stable at pH 4 to 10.

(57) 要約: 本発明の目的は、コモチイソギンチャク (*Cnidopus japonicus*) に由来する新規な色素蛋白質を提供することである。本発明によれば、コモチイソギンチャク (*Cnidopus japonicus*) 由来の下記の特性を有する色素蛋白質が提供される。(1) 吸収極大波長が 559 nm であり、蛍光極大波長が 578 nm である; (2) 559 nm におけるモル吸光係数が 61150 である; (3) 量子収率が 0.01 未満である; (4) 光吸収特性の pH 感受性が pH 4 ~ 10 で安定である;

WO 03/104461 A1

明細書

色素蛋白質

技術分野

本発明は、新規な色素蛋白質に関する。より詳細には、本発明は、コモチイソギンチャク (*Chidopus japonicus*) 由来の新規な色素蛋白質及びその利用に関する。

背景技術

クラゲのエクオレア・ビクトリア (*Aequorea victoria*) に由来する緑色蛍光蛋白質 (GFP) は、生物系において多くの用途を有する。最近、ランダム突然変異誘発法および半合理的 (semi-rational) 突然変異誘発法に基づいて、色を変化させたり、折りたたみ特性を改善したり、輝度を高めたり、あるいは pH 感受性を改変したといった様々な GFP 変異体が作製されている。遺伝子組み換え技術により他の蛋白質を GFP 等の蛍光蛋白質に融合させて、それらの発現および輸送のモニタリングを行うことが行われている。

最もよく使用される GFP 変異体の一つとして黄色蛍光蛋白質 (YFP) が挙げられる。YFP は、クラゲ (*Aequorea*) GFP 変異体の中でも最長波長の蛍光を示す。大部分の YFP の ϵ および Φ は、それぞれ $60,000 \sim 100,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ および $0.6 \sim 0.8$ であり (Tsien, R. Y. (1998). *Ann. Rev. Biochem.* 67, 509-544)、これらの値は、一般的な蛍光団 (フルオレセインおよびローダミンなど) の値に匹敵する。従って YFP の絶対的輝度の改善は、ほぼ限界に達しつつある。

また、GFP 変異体の他の例として、シアン蛍光蛋白質 (CFP) があり、E CFP (enhanced cyan fluorescent protein) が知られている。また、イソギンチャク (*Discoma* sp.) からは赤色蛍光蛋白質 (RFP) も単離されており、DasRed が知られている。このように蛍光蛋白質は、緑色、黄色、シアン色、赤色の 4 種が次々と開発されスペクトルの範囲は大幅に広がっている。

発明の開示

本発明は、コモチイソギンチャク (*Cnidopus japonicus*) に由来する新規な色素蛋白質を提供することを解決すべき課題とした。

上記課題を解決するために本発明者らは鋭意検討し、既知の蛍光蛋白質のアミノ酸配列の情報に基づいて好適なプライマーを設計し、紫色を呈するコモチイソギンチャク (*Cnidopus japonicus*) の cDNA ライブラリーから上記プライマーを用いて新規な色素蛋白質をコードする遺伝子を増幅してクローニングすることに成功した。さらに本発明者らは、得られたコモチイソギンチャク (*Cnidopus japonicus*) 由来の色素蛋白質の光吸収特性及び pH 感受性を解析した。本発明は、これらの知見に基づいて完成したものである。

即ち、本発明によれば、コモチイソギンチャク (*Cnidopus japonicus*) 由来の下記の特性を有する色素蛋白質が提供される。

- (1) 吸収極大波長が 559 nm であり、蛍光極大波長が 578 nm である；
- (2) 559 nm におけるモル吸光係数が 61150 である；
- (3) 量子収率が 0.01 未満である；
- (4) 光吸収特性の pH 感受性が pH 4～10 で安定である；

本発明の別の側面によれば、以下の何れかのアミノ酸配列を有する色素蛋白質が提供される。

- (a) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列；又は、
- (b) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、吸光特性を有するアミノ酸配列；

本発明のさらに別の側面によれば、本発明の蛋白質をコードする DNA が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、以下の何れかの DNA が提供される。

- (a) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列をコードする DNA；又は、

(b) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、吸光特性を有するアミノ酸配列をコードする DNA :

本発明のさらに別の側面によれば、以下の何れかの塩基配列を有する DNA が提供される。

(a) 配列番号 2 に記載の塩基配列 ; 又は、

(b) 配列番号 2 に記載の塩基配列において 1 から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、吸光特性を有する蛋白質をコードする塩基配列 :

本発明のさらに別の側面によれば、本発明の DNA を有する組み換えベクターが提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、本発明の DNA 又は組み換えベクターを有する形質転換体が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、本発明の色素蛋白質と他の蛋白質とから成る融合蛋白質が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、本発明の色素蛋白質をアクセプター蛋白質として用いて FRET (蛍光共鳴エネルギー転移) 法を行うことを特徴とする、生理活性物質の分析方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、本発明の色素蛋白質、DNA、組み換えベクター、形質転換体、又は融合蛋白質を含む、吸光試薬キットが提供される。

図面の簡単な説明

図 1 は、本発明のコモチイソギンチャク由来の色素蛋白質 (KP) の吸光スペクトルを測定した結果を示す。横軸は吸収光の波長を示し、縦軸は吸光度を示す。

図 2 は、本発明のコモチイソギンチャク由来の色素蛋白質 (KP) の吸光スペクトルの pH 感受性を示す。横軸は pH 値を示し、縦軸は吸光度を示す。559nm は本発明のコモチイソギンチャク由来の色素蛋白質 (KP) 特有の吸光度を示し、275nm は一般的に蛋白質定量として使われる吸光度 (芳香族アミノ酸の吸光) を

示す。つまり、275nm の値で蛋白質量が一定である事を示し、559nm の値で本発明のコモチイソギンチャク由来の色素蛋白質 (K P) 特有の吸光度が pH 4 ~ pH 10 においてほとんど変化しないことを示す。

図 3 は、本発明のコモチイソギンチャク由来の色素蛋白質 (K P) の蛍光スペクトルを示す。横軸は波長を示し、縦軸は蛍光の強度を示す。em は蛍光スペクトルを示し、ex は励起スペクトルを示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

(1) 本発明の色素蛋白質

本発明の色素蛋白質は、コムチイソギンチャク (*Cnidopus japonicus*) 由来のものであり、下記の特性を有することを特徴とする。

- (1) 吸収極大波長が 559 nm であり、蛍光極大波長が 578 nm である；
- (2) 559 nm におけるモル吸光係数が 61150 である；
- (3) 量子収率が 0.01 未満である；
- (4) 光吸収特性の pH 感受性が pH 4 ~ 10 で安定である；

コムチイソギンチャク (*Cnidopus japonicus*) は、刺胞動物 (CNIDARIA) の花虫綱 (Anthozoa) に属するイソギンチャクの 1 種であり、わが国のイソギンチャクのなかで、最も色彩変異が多い。体高は常に低く、体壁にたくさんのイボをもつ。触手は約 200 本で短い。親は発生の進んだ胚を口部から吐き出し、自分の体壁に着ける。胚はさらに発生が進み親の体壁上で赤ちゃんイソギンチャクとなるためにコムチイソギンチャクとの名が付いた。本種は北海道～房総半島の岩礁海岸の潮間帯とその直下に分布する。

なお、本書中以下の実施例では、コムチイソギンチャク (*Cnidopus japonicus*) を出発材料として上記特性を有する色素蛋白質を単離したが、コムチイソギンチャク以外のイソギンチャクから本発明の色素蛋白質を取得することができる場合もあり、そのような色素蛋白質も本発明の範囲内である。

本発明の色素蛋白質は、以下の実施例で示す通り、吸収極大波長が559 nmであり、蛍光極大波長が578 nmである。また、559 nmにおけるモル吸光係数は61150であり、量子収率は0.01未満である。

モル吸光係数は蛍光分子1モルあたりの光子の吸収量を表し、量子収率は吸収した光子のどれだけを蛍光として発することができるかを表した数値である。本発明の色素蛋白質の量子収率は0.01未満と極めて低いため、発せられる赤色(578 nm)の蛍光も極めて弱い。この性質から、本発明の色素蛋白質は、(1) FRETのアクセプター分子(エネルギー受容体)として用いたり、(2) 照射した光のエネルギーを光以外のエネルギーに変換させるシステムの開発に利用したり、あるいは(3) 蛋白質のアミノ酸配列に変異を導入して蛍光を発するように改変することなどに用いることができる。

また、本発明の色素蛋白質は、光吸収特性のpH感受性がpH4~10で安定であることを特徴とする。即ち、本発明の色素蛋白質では、pH4~10の範囲において吸収スペクトルのピーク値の変動が少ない。従って、本発明の色素蛋白質は、広範囲のpH環境において同様の条件で 사용할ことができ、生体内での使用に際しての制約は少ない。

本発明の色素蛋白質の具体例としては、以下の何れかのアミノ酸配列を有する色素蛋白質が挙げられる。

(a) 配列番号1に記載のアミノ酸配列；又は、

(b) 配列番号1に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、吸光特性を有するアミノ酸配列；

本明細書で言う「1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列」における「1から数個」の範囲は特には限定されないが、例えば、1から20個、好ましくは1から10個、より好ましくは1から7個、さらに好ましくは1から5個、特に好ましくは1から3個程度を意味する。

本明細書で言う「吸光特性」とは、ある波長の光を吸収できる特性を意味し、

例えば、本明細書に示した色素蛋白質と同様に吸収極大波長が559nmであってもよいし、あるいは吸収極大波長の値がシフトしたものであってもよい。なお、光吸収特性のpH感受性は、pH4～10で安定であることが好ましい。

本発明の配列表の配列番号1に記載したアミノ酸配列を有する色素蛋白質は量子収率が0.01未満であり極めて弱い蛍光を発するものである。本発明においては、配列番号1に記載したアミノ酸配列に対して1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を導入することにより、より強い蛍光を発する蛋白質を作製してもよく、このような蛋白質も本発明の範囲内に含まれる。

本発明の色素蛋白質の取得方法については特に制限はなく、化学合成により合成した蛋白質でもよいし、遺伝子組み換え技術による作製した組み換え蛋白質でもよい。

組み換え蛋白質を作製する場合には、先ず当該蛋白質をコードするDNAを入手することが必要である。本明細書の配列表の配列番号1に記載したアミノ酸配列並びに配列番号2に記載した塩基配列の情報を利用することにより適当なプライマーを設計し、それらを用いて、コモチイソギンチャク (*Chidopus japonicus*) 由来のcDNAライブラリーを鋳型にしてPCRを行うことにより、本発明の色素蛋白質をコードするDNAを取得することができる。このDNAを適当な発現系に導入することにより、本発明の色素蛋白質を産生することができる。発現系での発現については本明細書中後記する。

(2) 本発明のDNA

本発明によれば、本発明の色素蛋白質をコードする遺伝子が提供される。

本発明の色素蛋白質をコードするDNAの具体例としては、以下の何れかのDNAが挙げられる。

- (a) 配列番号1に記載のアミノ酸配列をコードするDNA；又は、
- (b) 配列番号1に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、吸光特性を有するアミノ酸配

列をコードするDNA：

本発明の色素蛋白質をコードするDNAの更なる具体例としては、以下の何れかの塩基配列を有するDNAが挙げられる。

(a) 配列番号2に記載の塩基配列；又は、

(b) 配列番号2に記載の塩基配列において1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、吸光特性を有する蛋白質をコードする塩基配列：

本発明のDNAは、例えばホスホアミダイト法などにより合成することができるし、特異的プライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって製造することもできる。本発明のDNAの作製方法については、本明細書中上述した通りである。

また、所定の核酸配列に所望の変異を導入する方法は当業者に公知である。例えば、部位特異的変異誘発法、縮重オリゴヌクレオチドを用いるPCR、核酸を含む細胞の変異誘発剤又は放射線への露出等の公知の技術を適宜使用することによって、変異を有するDNAを構築することができる。このような公知の技術は、例えば、Molecular Cloning: A laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY., 1989、並びに Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1~38, John Wiley & Sons (1987-1997)に記載されている。

(3) 本発明の組み換えベクター

本発明のDNAは適当なベクター中に挿入して使用することができる。本発明で用いるベクターの種類は特に限定されず、例えば、自立的に複製するベクター（例えばプラスミド等）でもよいし、あるいは、宿主細胞に導入された際に宿主細胞のゲノムに組み込まれ、組み込まれた染色体と共に複製されるものであってもよい。

好ましくは、本発明で用いるベクターは発現ベクターである。発現ベクターに

において本発明のDNAは、転写に必要な要素（例えば、プロモーター等）が機能的に連結されている。プロモータは宿主細胞において転写活性を示すDNA配列であり、宿主の種類に応じて適宜することができる。

細菌細胞で作動可能なプロモータとしては、バチルス・ステアロテルモフィルス・マルトジェニック・アミラーゼ遺伝子 (*Bacillus stearothermophilus maltogenic amylase gene*)、バチルス・リケニホルミス α アミラーゼ遺伝子 (*Bacillus licheniformis alpha-amylase gene*)、バチルス・アミロリケファチエンス・BAN アミラーゼ遺伝子 (*Bacillus amyloliquefaciens BAN amylase gene*)、バチルス・サブチリス・アルカリプロテアーゼ遺伝子 (*Bacillus Subtilis alkaline protease gene*) もしくはバチルス・プミルス・キシロシダーゼ遺伝子 (*Bacillus pumilus xylosidase gene*) のプロモータ、またはファージ・ラムダの P_R 若しくは P_L プロモータ、大腸菌の *lac*、*trp* 若しくは *tac* プロモータなどが挙げられる。

哺乳動物細胞で作動可能なプロモータの例としては、SV40プロモータ、MT-1（メタロチオネイン遺伝子）プロモータ、またはアデノウイルス2主後期プロモータなどがある。昆虫細胞で作動可能なプロモータの例としては、ポリヘドリンプロモータ、P10プロモータ、オートグラフィア・カリホルニカ・ポリヘドロシス塩基性タンパクプロモータ、バキュウロウイルス即時型初期遺伝子1プロモータ、またはバキュウロウイルス39K遅延型初期遺伝子プロモータ等がある。酵母宿主細胞で作動可能なプロモータの例としては、酵母解糖系遺伝子由来のプロモータ、アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子プロモータ、TP11プロモータ、ADH2-4cプロモータなどが挙げられる。

糸状菌細胞で作動可能なプロモータの例としては、ADH3プロモータまたは *tpiA* プロモータなどがある。

また、本発明のDNAは必要に応じて、例えばヒト成長ホルモントーミネータまたは真菌宿主についてはTP11ターミネータ若しくはADH3ターミネータのような適切なターミネータに機能的に結合されてもよい。本発明の組み換えベ

クターは更に、ポリアデニレーションシグナル(例えばSV40またはアデノウイルス5E1b領域由来のもの)、転写エンハンサ配列(例えばSV40エンハンサ)および翻訳エンハンサ配列(例えばアデノウイルスVA RNAをコードするもの)のような要素を有していてもよい。

本発明の組み換えベクターは更に、該ベクターが宿主細胞内で複製することを可能にするDNA配列を具備してもよく、その一例としてはSV40複製起点(宿主細胞が哺乳類細胞のとき)が挙げられる。

本発明の組み換えベクターはさらに選択マーカ含有してもよい。選択マーカとしては、例えば、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)またはシゾサッカロマイセス・ポンベTPI遺伝子等のようなその補体が宿主細胞に欠けている遺伝子、または例えばアンピシリン、カナマイシン、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、ネオマイシン若しくはヒグロマイシンのような薬剤耐性遺伝子を挙げることができる。

本発明のDNA、プロモータ、および所望によりターミネータおよび/または分泌シグナル配列をそれぞれ連結し、これらを適切なベクターに挿入する方法は当業者に周知である。

(4) 本発明の形質転換体

本発明のDNA又は組み換えベクターを適当な宿主に導入することによって形質転換体を作製することができる。

本発明のDNAまたは組み換えベクターを導入される宿主細胞は、本発明のDNA構築物を発現できれば任意の細胞でよく、細菌、酵母、真菌および高等真核細胞等が挙げられる。

細菌細胞の例としては、バチルスまたはストレプトマイセス等のグラム陽性菌又は大腸菌等のグラム陰性菌が挙げられる。これら細菌の形質転換は、プロトプラスト法、または公知の方法でコンピテント細胞を用いることにより行なえばよい。

哺乳類細胞の例としては、HEK 293細胞、HeLa細胞、COS細胞、BHK細胞、CHL細胞またはCHO細胞等が挙げられる。哺乳類細胞を形質転換し、該細胞に導入されたDNA配列を発現させる方法も公知であり、例えば、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等を用いることができる。

酵母細胞の例としては、サッカロマイセスまたはシゾサッカロマイセスに属する細胞が挙げられ、例えば、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) またはサッカロマイセス・クルイベリ (*Saccharomyces kluyveri*) 等が挙げられる。酵母宿主への組み換えベクターの導入方法としては、例えば、エレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法等を挙げることができる。

他の真菌細胞の例は、糸状菌、例えばアスペルギルス、ニューロスポラ、フザリウム、またはトリコデルマに属する細胞である。宿主細胞として糸状菌を用いる場合、DNA構築物を宿主染色体に組み込んで組換え宿主細胞を得ることにより形質転換を行うことができる。DNA構築物の宿主染色体への組み込みは、公知の方法に従い、例えば相同組換えまたは異種組換えにより行うことができる。

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、蛋白質を発現させることができる（例えば、*Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual* ; 及び *カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー, Bio/Technology, 6, 47 (1988)* 等に記載）。

バキュロウイルスとしては、例えば、ヨトウガ科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフア・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス (*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*) 等を用いることができる。

昆虫細胞としては、*Spodoptera frugiperda* の卵巣細胞である Sf 9、Sf 21 [バキュロウイルス・エクスプレッション・ベクターズ、ア・ラボラトリー・

マニュアル、ダブリュー・エイチ・フリーマン・アンド・カンパニー(W. H. Freeman and Company)、ニューヨーク(New York)、(1992)]、*Trichoplusia ni*の卵巣細胞であるH i F i v e (インビトロジェン社製)等を用いることができる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法又はリポフェクション法等を挙げることができる。

上記の形質転換体は、導入されたDNA構築物の発現を可能にする条件下で適切な栄養培地中で培養する。形質転換体の培養物から、本発明の蛋白質を単離精製するには、通常の蛋白質の単離、精製法を用いればよい。

例えば、本発明の蛋白質が、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し水系緩衝液に懸濁後、超音波破碎機等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、通常の蛋白質の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル(DEAE)セファロース等のレジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF(ファルマシア社製)等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

(5) 本発明の色素蛋白質及びそれを含む融合蛋白質の利用

本発明の色素蛋白質は、他の蛋白質と融合させることにより、融合蛋白質を構築することができる。本発明の色素蛋白質に融合させる他の蛋白質の種類は特に限定されないが、他の分子と相互作用する蛋白質であることが好ましく、例えば、受容体蛋白質又はそのリガンド、あるいは抗原又は抗体などが挙げられる。

本発明の融合蛋白質の取得方法については特に制限はなく、化学合成により合

成した蛋白質でもよいし、遺伝子組み換え技術による作製した組み換え蛋白質でもよい。

組み換え融合蛋白質を作製する場合には、先ず当該蛋白質をコードするDNAを入手することが必要である。本発明の色素蛋白質をコードするDNAおよびそれに融合すべき他の蛋白質をコードするDNAは、本明細書中上記した方法またはそれに準じてそれぞれ入手することができる。次いで、これらのDNA断片を順番に遺伝子組み換え技術により連結することにより、所望の融合蛋白質をコードするDNAを得ることができる。このDNAを適当な発現系に導入することにより、本発明の融合蛋白質を産生することができる。

分子間の相互作用を分析する手法の一つとして、FRET（蛍光共鳴エネルギー転移）が知られている。FRETでは、例えば、第一の蛍光蛋白質としてのシアン蛍光蛋白質（CFP）で標識した第一の分子と、第二の蛍光蛋白質としての黄色蛍光蛋白質（YFP）で標識した第二の分子とを共存させることにより、黄色蛍光蛋白質（YFP）をアクセプター分子として作用させ、シアン蛍光蛋白質（CFP）をドナー分子として作用させ、両者の間でFRET（蛍光共鳴エネルギー転移）を生じさせることにより、第一の分子と第二の分子との間の相互作用を可視化することができる。即ち、FRETでは2種類の分子にそれぞれ異なる色素を導入し、エネルギーレベルの高い方の色素（ドナー分子）を選択的に励起し、その色素の蛍光を測定し、もう一方の色素（アクセプター分子）からの長波長蛍光も測定して、それらの蛍光変化量によって分子間の相互作用を可視化する。両方の色素が、2種類の分子の相互作用によって近接したときのみドナー分子の蛍光の減少とアクセプター分子の蛍光の増加が1波長励起2波長測光法により観測される。しかし、アクセプター分子に色素蛋白質を用いた場合は、両方の色素が、2種類の分子の相互作用によって近接したときのみドナー分子の蛍光の減少を生じ1波長励起1波長測光法により観測することができる。即ち、測定機器の簡易化が可能となる。

本発明の色素蛋白質は、特に、FRET（蛍光共鳴エネルギー転移）における

アクセプター分子としての利用価値が高い。即ち、本発明の色素蛋白質と被験物質との融合体（第一の融合体）を作製する。次いで、該被験物質と相互作用する別の被験物質と別の蛍光蛋白質との融合体（第2の融合体）を作製する。そして、第一の融合体と第2の融合体とを相互作用させ、発する蛍光を分析することにより、上記2種類の被験物質間の相互作用を分析することができる。なお、本発明の色素蛋白質を用いたFRET（蛍光共鳴エネルギー転移）は、試験管内で行ってもよいし、細胞内で行ってもよい。

（6）本発明のキット

本発明によれば、本明細書に記載した色素蛋白質、融合蛋白質、DNA、組み換えベクター又は形質転換体から選択される少なくとも1種以上を含むことを特徴とする、吸光試薬キットが提供される。本発明のキットは、それ自体既知の通常用いられる材料及び手法で調製することができる。

色素蛋白質又はDNAなどの試薬は、適当な溶媒に溶解することにより保存に適した形態に調製することができる。溶媒としては、水、エタノール、各種緩衝液などを用いることができる。

以下の実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

実施例

実施例1：イソギンチャクからの新規色素蛋白質遺伝子の単離

（1）全RNAの抽出

紫色を呈する珊瑚より色素蛋白質遺伝子の単離を行った。材料には紫色を呈するコモチイソギンチャク（*Cnidopus japonicus*）を用いた。凍結したコモチイソギンチャクを乳鉢で砕き、湿重量1グラムに”TRIzol”（GIBCO BRL）を7.5ml加えてホモジナイズし、1500xgで10分間遠心した。上清にクロロホルム1.5mlを加え、15秒間攪拌した後、3分間静置した。7500xgで15分間遠心した。上清

にイソプロパノール3.75mlを加え、15秒間攪拌した後10分間静置した。17000xgで10分間遠心した。上清を捨て70%エタノールを6ml加えて17000xgで10分間遠心した。上清を捨て沈殿をDEPC水200 μ lで溶解した。DEPC水で溶解した全RNAを100倍に希釈してO.D.260とO.D.280の値を測定してRNA濃度を測った。紫色の個体から2mgのtotal RNAを得た。

(2) First strand cDNAの合成

全RNA 4 μ gを使用し、First strand cDNAの合成キット”Ready To Go”(Amersham Pharmacia)によりcDNA(33 μ l)を合成した。

(3) Degenerated PCR

合成したFirst strand cDNA(33 μ l)のうち3 μ lを鋳型としてPCRを行った。

プライマーのデザインは既知の蛍光蛋白のアミノ酸配列を見比べて、似ている部分を抜き出し、塩基配列に変換し直し作製した。使用プライマーの配列を以下に示す。

5' - GAAGGRTGYGTCAAYGGRCAY-3' (primer1; 配列番号3)

5' - ACVGGDCCATYDGAAGAAARTT-3' (primer2; 配列番号4)

(ここで、RはA又はGを示し、YはC又はTを示し、VはA、C又はGを示し、DはA、G又はTを示す。)

PCR 反応液組成

テンプレート (first strand cDNA)	3 μ l
X10 taq バッファー	5 μ l
2.5mM dNTPs	4 μ l
100 μ M primer1	1 μ l
100 μ M primer2	1 μ l
ミリQ	35 μ l
taq polymerase (5U/ μ l)	1 μ l

PCR 反応条件

94°C 1分 (PAD)

94°C 30 秒 (変性)

52°C 30 秒 (プライマーのテンプレートへのアニーリング)

72°C 1 分 (プライマー伸長)

上記3ステップを30サイクル行い、アニーリング温度を1サイクルごとに0.3°C下げた。30サイクル時の温度は43°Cとなる。

72°C 7 分 (最後の伸長)

4°Cで保持

一回目のPCR反応で得られた増幅産物1 μ l をテンプレートとして、もう一度同じ条件でPCRを行った。アガロースゲル電気泳動で、350bp(紫色の個体由来)のバンドを切り出し、精製した。

(4) サブクローニング及び塩基配列の決定

精製したDNA断片をpT7-blue vector (Novagen)にライゲーションした。大腸菌株 (TG1) にトランスフォーメーションしてブルーホワイトセクションを行い、白いコロニーの大腸菌よりプラスミドDNAを精製して、挿入されたDNA断片の塩基配列をDNAシーケンサーにより決定した。得られた塩基配列を他の蛍光蛋白遺伝子の塩基配列と比較してそのDNA塩基配列が蛍光蛋白由来のものであるかを判断した。蛍光蛋白遺伝子の一部であると判断したものに関して、5' -RACE法および3' -RACE法による遺伝子全長のクローニングを行った。

(5) 5' -RACE 法

Degenerated PCR で得られたDNA断片の5'側の塩基配列を決定するために5' -RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0 (GIBCO BRL)を用いて、5' -RACE法を行った。鋳型として(1)で調整した全RNAを3 μ g使用した。

紫色の個体由来のDC-tailed cDNAの一回目の増幅には

5' -GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG-3' (primer3) (配列番号5)

5' -ATAGATCAGGCAATCTCCC -3' (primer4) (配列番号6)

のプライマーを用いた。

(ここで、I はイノシンを示す)

二回目の増幅には

5' -GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3' (primer5) (配列番号 7)

5' -GGTGAGCTGTGAGGTGACCA-3' (primer6) (配列番号 8)

のプライマーを用いた。PCR 反応条件等はキットのプロトコールに準じた。

アガロースゲル電気泳動で、増幅された 450bp のバンドを切り出し、精製した。精製した DNA 断片を pT7-blue vector (Novagen) にライゲーションした。大腸菌株 (TG1) にトランスフォーメーションしてブルーホワイトセクションを行い、白いコロニーの大腸菌より plasmid DNA を精製して、挿入された DNA 断片の塩基配列を DNA シークエンサーにより決定した。

(6) 3' -RACE 法

Degenerated PCR で得られた DNA 断片の 3' 側部分は、以下のプライマー (4) の塩基配列決定で得られた情報を基に作製した primer7 と、以下の primer8 を用いた PCR で得た。鋳型として (2) で調整した first strand cDNA を 3 μ l 使用した。使用したプライマーを以下に示す。

5' - CACCGAAGGCGGGCCATTGC -3' (primer7) (配列番号 9)

5' - AACTGGAAGAATTGCGGCCGCGAGAATTTTTTTTTTTTTTTTTT -3' (primer8) (配列番号 10)

PCR 反応液組成

テンプレート (first strand cDNA)	3 μ l
X10 taq バッファー	5 μ l
2.5mM dNTPs	4 μ l
20 μ M primer7	1 μ l
10 μ M primer8	1 μ l
ミリ Q	35 μ l
taq polymerase (5U/ μ l)	1 μ l

PCR 反応条件

94°C 1分(PAD)

94°C 30秒(変性)

55°C 30秒(プライマーのテンプレートへのアニーリング)

72°C 1分(プライマー伸長)

上記3ステップを30サイクル行った。

72°C 7分(最後の伸長)

4°Cで保持

アガロースゲル電気泳動で、増幅された約1200bpのバンドを切り出し、精製した。精製したDNA断片をpT7-blue vector(Novagen)にライゲーションした。大腸菌株(TG1)にトランスフォーメーションしてブルーホワイトセクションを行い、白いコロニーの大腸菌より plasmid DNA を精製して、挿入されたDNA断片の塩基配列をDNAシーケンサーにより決定した。得られた全長の塩基配列を配列番号2に示し、全長のアミノ酸配列を配列番号1に示す。

実施例2：大腸菌での蛋白質の発現

実施例1で得られた全長の塩基配列より、蛋白のN末端、C末端に相当する部分でプライマーを作製し、(2)で調整したFirst strand cDNAを鋳型としてPCRを行った。

使用プライマー

5' - CGGGATCCGACCATGGCTTCAATGATTAAAG-3' (primer9) (配列番号11)

5' - CCGGAATTCTTAGTGCTTTGACGGGGCAACATC-3' (primer10) (配列番号12)

PCR反応液組成

テンプレート (first strand cDNA)	3 μ l
X10 pyrobest バッファー	5 μ l
2.5mM dNTPs	4 μ l
100 μ M primer9	1 μ l
100 μ M primer10	1 μ l

ミリ Q 35 μ l

pyrobest polymerase (5U/ μ l) 1 μ l

PCR 反応条件

94°C 1 分 (PAD)

94°C 30 秒 (変性)

55°C 30 秒 (プライマーのテンプレートへのアニーリング)

72°C 1 分 (プライマー伸長)

上記 3 ステップを 30 サイクル行った。

72°C 7 分 (最後の伸長)

4°C で保持

アガロースゲルの電気泳動で、増幅された約 700bp のバンドを切り出し、精製して pRSET vector (Invitrogen) の *Bam*H I、*Eco*R I 部位にサブクローニングして、大腸菌株 (JM109-DE3) で発現させた。発現蛋白は N 末端に His-tag が付くようにコンストラクトしたので発現蛋白は Ni-Agarose gel (QIAGEN) で精製した。精製の方法は付属のプロトコールに準じた。

実施例 3 : 蛋白質の解析

(1) 光吸収特性の解析

実施例 2 で発現させた蛋白質を用いて光吸収特性を解析した。

20 μ M の色素蛋白、50mM HEPES pH7.5 溶液を用いて吸収スペクトルを測定した。

このスペクトルのピークの値よりモル吸光係数を計算した。紫色の個体由来色素蛋白 (KP とした) では 559nm に吸収のピークが認められた (表 1、図 1)。KP は 578nm ピークをもつ非常に弱い蛍光が認められた (図 3)。

表 1

色素蛋白質 (K P) の性質

吸収極大	蛍光極大	モル吸光係数	量子収率	p H感受性	アミノ酸数
559nm	578nm	61150 (559nm)	0.01>	なし	229

(2) p H感受性の測定

実施例 2 で発現させた蛋白質を用いて p H感受性を解析した。

100mM の下記の緩衝液中で蛋白質の吸収スペクトルを測定した (図 2)。

各 pH の緩衝液は次の通り、

pH4、5 : 酢酸バッファー

pH6 : MES バッファー

pH7、8 : HEPES バッファー

pH9、10 : グリシンバッファー

各 pH でピークの値はほとんど変化しなかった。

産業上の利用の可能性

本発明により、コモチイソギンチャク (*Cnidopus japonicus*) 由来の新規な色素蛋白質が提供されることになった。本発明の色素蛋白質は、所望の蛍光特性を有し、また p H感受性が低いことから、分子生物学的分析において有用である。

請求の範囲

1. コモチイソギンチャク (*Cnidopus japonicus*) 由来の下記の特性を有する色素蛋白質。

- (1) 吸収極大波長が 559 nm であり、蛍光極大波長が 578 nm である；
- (2) 559 nm におけるモル吸光係数が 61150 である；
- (3) 量子収率が 0.01 未満である；
- (4) 光吸収特性の pH 感受性が pH 4～10 で安定である；

2. 以下の何れかのアミノ酸配列を有する色素蛋白質。

- (a) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列；又は、
- (b) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、吸光特性を有するアミノ酸配列；

3. 請求項 1 又は 2 に記載の蛋白質をコードする DNA。

4. 以下の何れかの DNA。

- (a) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列をコードする DNA；又は、
- (b) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、吸光特性を有するアミノ酸配列をコードする DNA；

5. 以下の何れかの塩基配列を有する DNA。

- (a) 配列番号 2 に記載の塩基配列；又は、
- (b) 配列番号 2 に記載の塩基配列において 1 から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、吸光特性を有する蛋白質をコードする塩基配列；

6. 請求項 4 又は 5 に記載の DNA を有する組み換えベクター。

7. 請求項 4 又は 5 に記載の DNA 又は請求項 6 に記載の組み換えベクターを有する形質転換体。

8. 請求項 1 又は 2 に記載の色素蛋白質と他の蛋白質とから成る融合蛋白質。

9. 請求項 1 又は 2 に記載の色素蛋白質をアクセプター蛋白質として用いて FRET (蛍光共鳴エネルギー転移) 法を行うことを特徴とする、生理活性物質の分析方法。

10. 請求項 1 又は 2 に記載の色素蛋白質、請求項 3 から 5 の何れかに記載の DNA、請求項 6 に記載の組み換えベクター、請求項 7 に記載の形質転換体、又は請求項 8 に記載の融合蛋白質を含む、吸光試薬キット。

図 1

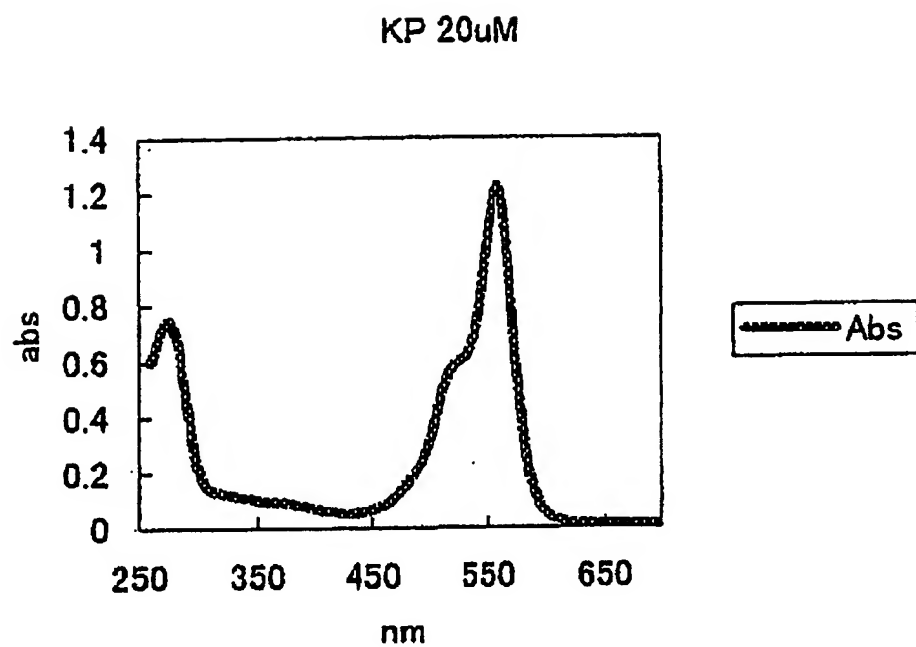


図 2

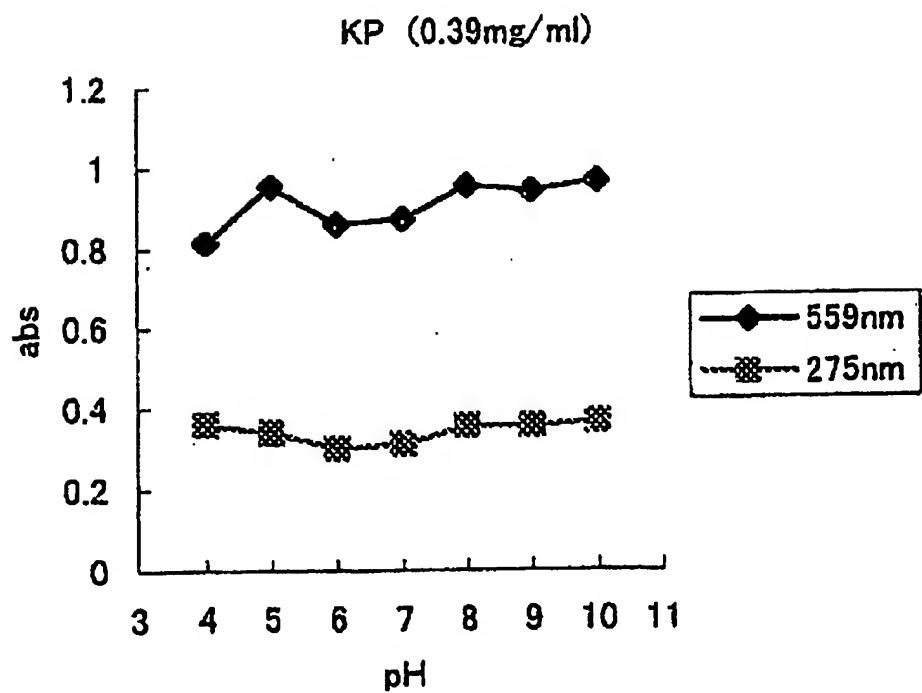
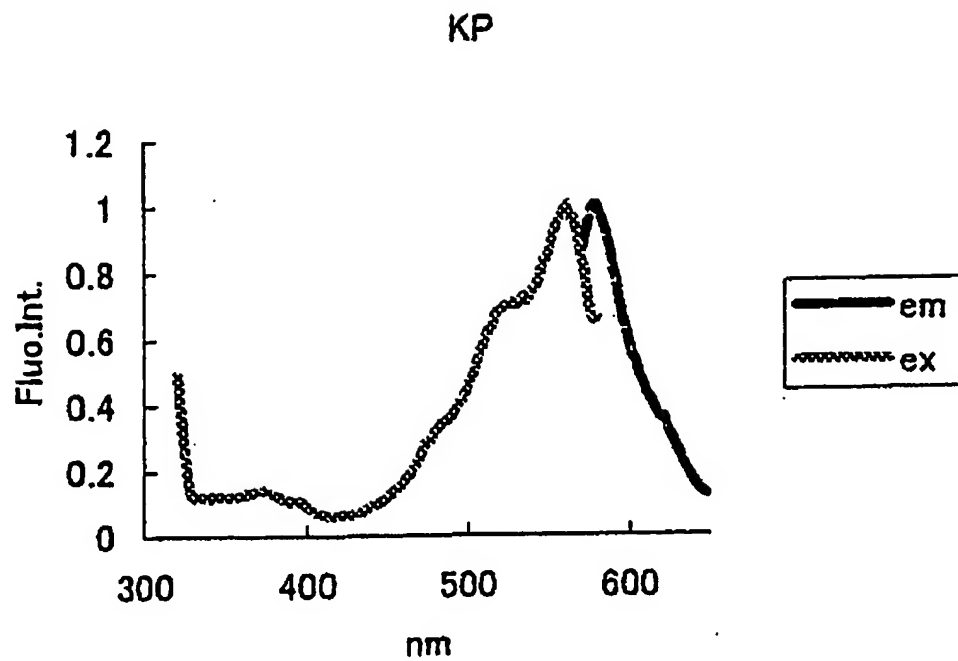


図3



SEQUENCE LISTING

<110> RIKEN

<120> Chromo protein

<130> A31348A

<160> 12

<210> 1

<211> 229

<212> PRT

<213> Cnidopus japonicus

<400> 1

Met Ala Ser Met Ile Lys Asp Val Met Arg Phe Lys Met Asn Met Glu

1 5 10 15

Gly Thr Val Asn Gly His His Phe Lys Cys Glu Ala Asp Gly Glu Gly

20 25 30

Lys Pro Tyr Glu Gly Thr Gln Leu Gly Arg Ile Arg Val Thr Glu Gly

35 40 45

Gly Pro Leu Pro Phe Ser Phe Asp Ile Leu Ser Thr Cys Thr Gln Tyr

50 55 60

Gly Ser Lys Thr Met Ile Lys His Leu Ser Gly Ile Pro Asp Tyr Phe

65 70 75 80

Lys Gln Ser Phe Pro Glu Gly Phe Thr Trp Glu Arg Asn Thr Ile Tyr

85 90 95

Glu Asp Gly Gly His Leu Thr Ala His Gln Asp Thr Ser Leu Lys Gly

100 105 110

Asp Cys Leu Ile Tyr Lys Val Lys Val Leu Gly Gly Asn Phe Pro Ala

115 120 125

Asn Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Ser Lys Gly Trp Glu Pro Cys Thr

130

135

140

Glu Met Leu Tyr Pro Arg Asp Gly Val Leu Cys Gly Gln Thr Leu Met

145

150

155

160

Ala Leu Lys Cys Ala Asn Gly Lys Asn Leu Thr Cys Gln Leu Arg Ser

165

170

175

Thr Tyr Arg Ser Arg Lys Gln Ala Ser Ala Leu Gln Thr Pro Gly Phe

180

185

190

His Phe Gly Asp His Arg Ile Glu Ile Leu Lys Glu Ala Glu Gly Gly

195

200

205

Asn Tyr Phe Glu Gln His Glu Thr Ser Val Ala Arg Tyr Cys Asp Val

210

215

220

Ala Pro Ser Lys His

225

<210> 2

<211> 690

<212> DNA

<213> *Cnidopus japonicus*

<400> 2

atg gct tca atg att aaa gac gtt atg cgc ttc aag atg aac atg gaa 48

Met Ala Ser Met Ile Lys Asp Val Met Arg Phe Lys Met Asn Met Glu

1

5

10

15

ggg acg gtt aac ggc cac cac ttc aag tgt gaa gct gat gga gag ggc 96

Gly Thr Val Asn Gly His His Phe Lys Cys Glu Ala Asp Gly Glu Gly

20

25

30

aag cca tat gaa ggc act caa ctc gga aga ata agg gtc acc gaa ggc 144

Lys Pro Tyr Glu Gly Thr Gln Leu Gly Arg Ile Arg Val Thr Glu Gly
 35 40 45
 ggg cca ttg ccg ttt tct ttc gac atc ttg tcg act tgc act caa tat 192
 Gly Pro Leu Pro Phe Ser Phe Asp Ile Leu Ser Thr Cys Thr Gln Tyr
 50 55 60
 gga agc aag acc atg atc aag cat ttg tcc ggg att cca gac tac ttt 240
 Gly Ser Lys Thr Met Ile Lys His Leu Ser Gly Ile Pro Asp Tyr Phe
 65 70 75 80
 aag cag tct ttt cca gaa gga ttc acc tgg gaa agg aac aca atc tat 288
 Lys Gln Ser Phe Pro Glu Gly Phe Thr Trp Glu Arg Asn Thr Ile Tyr
 85 90 95
 gag gat ggt ggt cac ctc aca gct cac caa gac act agt ctt aag gga 336
 Glu Asp Gly Gly His Leu Thr Ala His Gln Asp Thr Ser Leu Lys Gly
 100 105 110
 gat tgc ctg atc tat aaa gtg aaa gtc ctt gga ggt aat ttt cct gcc 384
 Asp Cys Leu Ile Tyr Lys Val Lys Val Leu Gly Gly Asn Phe Pro Ala
 115 120 125
 aat ggc cct gtg atg cag aag aag agc aaa gga tgg gaa ccc tgt acc 432
 Asn Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Ser Lys Gly Trp Glu Pro Cys Thr
 130 135 140
 gaa atg ctt tat cca cgt gat gga gtg ctt tgt ggc caa aca ttg atg 480
 Glu Met Leu Tyr Pro Arg Asp Gly Val Leu Cys Gly Gln Thr Leu Met
 145 150 155 160
 gca ctt aaa tgc gcc aat ggt aaa aat ctg act tgc cag cta aga tct 528
 Ala Leu Lys Cys Ala Asn Gly Lys Asn Leu Thr Cys Gln Leu Arg Ser
 165 170 175
 act tac agg tcc aga aaa caa gcc agt gca ttg cag aca cca ggc ttc 576

Thr Tyr Arg Ser Arg Lys Gln Ala Ser Ala Leu Gln Thr Pro Gly Phe
 180 185 190
 cat ttc gga gac cat cgt att gag ata ctc aag gaa gca gag ggg ggc 624
 His Phe Gly Asp His Arg Ile Glu Ile Leu Lys Glu Ala Glu Gly Gly
 195 200 205
 aat tac ttt gag cag cac gaa aca tca gtc gcc agg tac tgt gat gtt 672
 Asn Tyr Phe Glu Gln His Glu Thr Ser Val Ala Arg Tyr Cys Asp Val
 210 215 220
 gcc ccg tca aag cac tga 690
 Ala Pro Ser Lys His
 225

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 3

gaaggrtgyg tcaaygrca y 21

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 4

acvggdccaat ydgvaagaaa rtt

23

<210> 5

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 5

ggccacgcgt cgactagtac gggiigggi gggiig

36

<210> 6

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 6

atagatcagg caatctccc

19

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 7

ggccacgcgt cgactagtac

20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 8

ggtgagctgt gaggtgacca

20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 9

caccgaaggc gggccattgc

20

<210> 10

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 10

aactggaaga attcgcggcc gcagaatttt tttttttttt tttt 44

<210> 11

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 11

cgggatccga ccatggcttc aatgattaaa g 31

<210> 12

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 12

ccggaattct tagtgctttg acggggcaac atc 33

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/07337

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/12, 1/21, 5/10, C07K14/435, 19/00, G01N21/78

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/00-15/90, 1/21, 5/10, C07K14/00-14/825, 19/00, G01N21/78

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE (STN), WPI/BIOSIS (IALOG), JSTPlus (JOIS)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Atsushi MIYAWAKI, "Shiho Dobutsu to Keiko Tanpaku-Shitsu", Midoriishi, March, 2002, No.13, pages 1 to 4	1-10
A	WO 00/34319 A1 (CLONTECH LABORATORIES INC.), 15 June, 2000 (15.06.00), (Family: none)	1-10
A	WO 00/34526 A1 (CLONTECH LABORATORIES INC.), 15 June, 2000 (15.06.00), & EP 1135532 A1	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
27 June, 2003 (27.06.03)Date of mailing of the international search report
15 July, 2003 (15.07.03)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ¹ C12N 15/12, 1/21, 5/10, C07K 14/435, 19/00, G01N 21/78		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ¹ C12N 15/00-15/90, 1/21, 5/10, C07K 14/00-14/825, 19/00, G01N 21/78		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
MEDLINE (STN), WPI/BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS) GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	宮脇 敦史, 刺胞動物と蛍光タンパク質, みどりいし, 3月. 2002, 第13号, p. 1-4	1-10
A	WO 00/34319 A1 (CLONTECH LABORATORIES INC.) 2000.06.15 (ファミリーなし)	1-10
A	WO 00/34526 A1 (CLONTECH LABORATORIES INC.) 2000.06.15 & EP 1135532 A1	1-10
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	27.06.03	国際調査報告の発送日 15.07.03
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 三原 健治 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4N 2937